

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-346842

(43)Date of publication of application : 15.12.2000

(51)Int.Cl.

G01N 33/53
C12M 1/00
C12N 15/09
G01N 33/543
G01N 33/566
G01N 35/02

(21)Application number : 2000-109503

(71)Applicant : HITACHI LTD
HITACHI CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 11.04.2000

(72)Inventor : KANBARA HIDEKI
MIHASHI MASAHIITO

(30)Priority

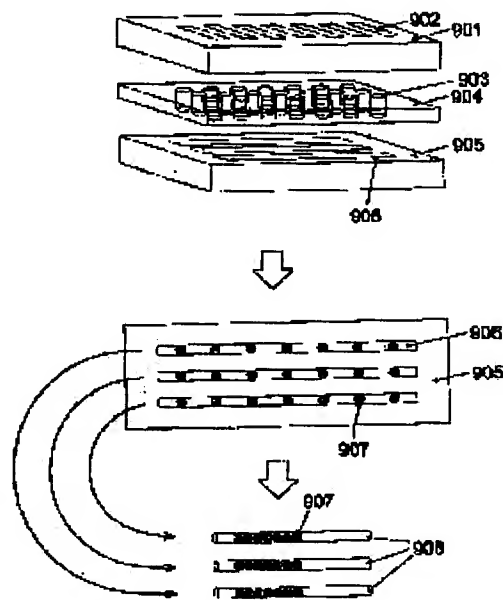
Priority number : 99 128861 Priority date : 12.04.1999 Priority country : US

(54) METHOD AND DEVICE FOR PRODUCTION OF PROBE ARRAY USING MICRO PARTICLES

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To enable a DNA probe to be produced on the surface of a solid material evenly by separating fixation of the probe to the surface of the solid material from arrangement of the probe.

SOLUTION: The interval between beads arranged substantially corresponds to an interval between bead receptors 902 of a bored sheet 904 and is about 2 mm. The number of probe beads 907 dropped into grooves 906 of a holder 905 for producing a bead alley is 50 in total in case. Though the number of bead alleys to be produced simultaneously is 10, it can be increased if required. After the beads are dropped thereinto, the positions of holes 903 of the bored sheet 904 and the grooves 906 of the holder 905 are shifted, then the grooves 906 are made airtight, and the beads are lead to capillaries 908 together with a solution. In increasing the kind of the beads 907, the operation is repeated. Though a one-dimensionally arranged probe bead alley is shown in this case, it is possible to produce alleys having many kinds of probes by arranging them in a plural manner or in a two-dimensional manner.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 06.11.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than

the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3746658

[Date of registration] 02.12.2005

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2000-346842
(P2000-346842A)

(43)公開日 平成12年12月15日(2000. 12. 15)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード*(参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M
			D
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 15/09		G 0 1 N 33/543	5 3 1
G 0 1 N 33/543	5 3 1	33/566	
審査請求 未請求 請求項の数18 O L (全 13 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000-109503(P2000-109503)

(22)出願日 平成12年4月11日(2000. 4. 11)

(31)優先権主張番号 60/128861

(32)優先日 平成11年4月12日(1999. 4. 12)

(33)優先権主張国 米国 (U S)

(71)出願人 000005108

株式会社日立製作所
東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(71)出願人 000004455

日立化成工業株式会社
東京都新宿区西新宿2丁目1番1号

(72)発明者 神原 秀配

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地
株式会社日立製作所中央研究所内

(72)発明者 三橋 将人

東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 日立
化成工業株式会社内

(74)代理人 100091096

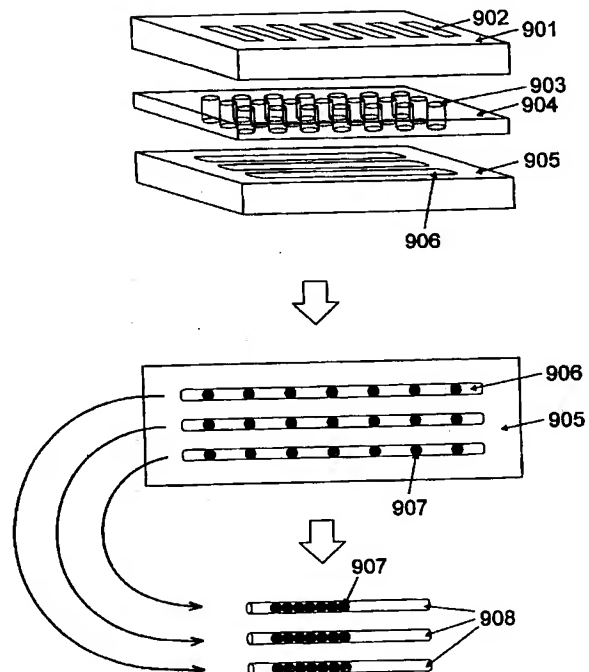
弁理士 平木 祐輔

(54)【発明の名称】 微粒子を用いたプローブアレーの作製方法及び装置

(57)【要約】

【解決手段】 プローブ付きのビーズを小さな穴に保持し、ついでキャピラリーあるいは溝に移動させ種類ごとに定められた順番でビーズを配列させてプローブビーズアレーを作製する。あるいは液体フロー中に定められた順番でプローブ付きビーズを流し込み、溝あるいはキャピラリーに収納し、定められた順番のプローブアレーをつくる。

【効果】 任意のプローブアレーを簡単に作ることができる。プローブのビーズ表面への固定は液相で配列プロセスとは別に行うことができるので、共有結合でしっかりとプローブを表面に固定することができ、均一でプローブが表面からはがれにくいプローブアレーが実現できる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 プローブの種類ごとに複数の微粒子にプローブを固定化し、複数のプローブに対する該微粒子を定められた個数ずつ集めてアレーとしたことを特徴とするプローブアレー。

【請求項 2】 微粒子表面にプローブを固定化し、該固定化微粒子をプローブの種類ごとに決められた順序で一次元あるいは二次元に配列させて生体関連物質のプローブアレーを構成することを特徴とするプローブアレーであって、マーカーとなる微粒子を一定間隔で配置したことを特徴とする、上記プローブアレー。

【請求項 3】 プローブごとに複数の微粒子をプローブアレーホルダーに保持せしめ、種類の異なるプローブを区分するためにサイズの異なる微粒子を分離隔壁として用いたことを特徴とするプローブアレー。

【請求項 4】 種々のプローブを固定化した微粒子をプローブの種類に従って決められた配列でキャピラリーあるいは光学セル内に並べる方法において、微粒子よりも大きな穴をもつシートと、該シートに接触し、キャピラリーを保持するか、または溝を有する基板とを相対的に移動可能とし、シートの穴にトラップした微粒子の位置を制御移動し、前記のキャピラリーまたは溝に上記微粒子を順次移送することを特徴とする、プローブアレーの作製方法。

【請求項 5】 単一種類のプローブを固定化した微粒子を穴付きシート上に散布して穴の部分に落とし込む工程と、穴に入らなかった余剰の微粒子を除去する工程と、穴部分に保持された微粒子をキャピラリーまたは溝に移送する工程とを繰り返すことを特徴とする、請求項 4 に記載のプローブアレーの作製方法。

【請求項 6】 複数の異なるプローブをそれぞれ固定化した複数の微粒子をシート上の異なる穴に保持し、プローブアレーホルダーまたは該プローブアレーホルダーにつながるキャピラリーへ種類ごとに定められた順序で移送することを特徴とする、請求項 4 に記載のプローブアレーの作製方法。

【請求項 7】 プローブを固定化した微粒子をプローブの種類に従って決められた配列でキャピラリーまたは光学セル内に並べる方法において、微粒子を導入細管に保持し、溶液と共に微粒子をひとつずつ制御しながら溶液流中に放出し、キャピラリー管内に導入することで種々のプローブ付き微粒子を決められた順序で配列保持してプローブアレーを作製する方法。

【請求項 8】 プローブを固定化した微粒子をプローブの種類ごとに異なる区画に分割保持し、その区画の底面にある穴に微粒子を保持し、これを別の基板平面に掘られた溝に落とし込むことによりプローブ付き微粒子を定められた順序で配列させ、ついで別途キャピラリー、溝または光学セルに移送すると同時に間隔を密集させてプローブアレーを作製する方法。

【請求項 9】 プローブを固体表面に固定化する手段と、プローブを定められた順序で配列させる手段とを独立して有することを特徴とするプローブアレーの作製装置。

【請求項 10】 種々のプローブを固定化した微粒子をプローブの種類にしたがって決められた配列でキャピラリーあるいは光学セル内に並べるプローブアレー作製装置において、微粒子よりも大きな穴をもつシートと、該シートに接触し、キャピラリーを保持するか、または溝を有する基板とを相対的に移動可能とする手段と、シートの穴にトラップした微粒子の位置を制御移動し、前記のキャピラリーまたは溝に上記微粒子を順次移送する手段とを有することを特徴とする、プローブアレーの作製装置。

【請求項 11】 単一種類のプローブを固定化した微粒子を穴付きシート上に散布して穴の部分に落とし込む手段と、穴に入らなかった余剰の微粒子を除去する手段と、穴部分に保持された微粒子をキャピラリーまたは溝に移送する手段とを有する、請求項 10 に記載のプローブアレーの作製装置。

【請求項 12】 複数の異なるプローブをそれぞれ固定化した複数の微粒子をシート上の異なる穴に保持する手段と、プローブアレーホルダーまたは該プローブアレーホルダーにつながるキャピラリーへ種類ごとに定められた順序で移送する手段とを有することを特徴とする、請求項 10 に記載のプローブアレーの作製装置。

【請求項 13】 プローブを固定化した微粒子をプローブの種類に従って決められた配列でキャピラリーまたは光学セル内に並べるプローブアレーの作製装置において、微粒子を導入細管に保持し、溶液と共に微粒子をひとつずつ制御しながら溶液流中に放出する手段と、キャピラリー管内に導入する手段と、導入された種々プローブ付き微粒子を決められた順序で配列保持する手段とを有することを特徴とする、プローブアレーの作製装置。

【請求項 14】 プローブを固定化した微粒子をプローブの種類ごとに異なる区画に分割保持する手段と、その区画の底面にある穴に微粒子を保持する手段と、これを別の基板平面に掘られた溝に落とし込むことによりプローブ付き微粒子を定められた順序で配列させる手段と、キャピラリー、溝または光学セルに移送すると同時に間隔を密集させる手段とを有する、プローブアレーの作製装置。

【請求項 15】 微粒子表面にプローブを固定化し、該固定化微粒子をプローブの種類ごとに決められた順序で一次元あるいは二次元に配列させ、生体関連物質のプローブアレーを構成することを特徴とするプローブアレーを有する分析装置。

【請求項 16】 上記プローブアレーが、プローブの種類ごとに微粒子に固定化し、該微粒子を複数集めてアレーとしたものであることを特徴とする、請求項 15 に記

載の分析装置。

【請求項 17】 一次元あるいは二次元に分布し、微粒子を保持できる穴を有するセルと、少なくとも各セルを区画している壁と、微粒子のサイズよりも小さな間隔におかれた光学的に透明な部材とで形成された微粒子アレーホルダーからなるプローブアレー。

【請求項 18】 請求項 1 から 3、及び 17 のいずれか一項に記載のプローブアレーを用いた分析装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明はペプチド、蛋白質、DNA、RNA等の生体関連物質の検出、診断、およびDNAをはじめとする生体関連物質の分析に用いるプローブアレーおよびその作製方法と作製装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 DNAの分析やDNA検査あるいは診断には微量のDNAを増幅する方法、得られたDNA断片を分離検出する方法等が必要である。DNAの増幅にはPCR (polymerase chain reaction) が広く用いられている。これによれば非常にわずかな量のDNAでもそのコピー数を数桁増やして検出できる。一方、種々DNAの分離検出にはゲル電気泳動と蛍光検出を組み合わせたDNAシーケンサーやフラグメントアナライザー等が用いられている。しかし、検体数が多くなったり、検査項目が多くなると電気泳動による方法では手間がかかる難点があり、DNAプローブを用いた簡便な方法が注目されはじめています。特に、プローブを固体表面に多種類固定したプローブアレーを作製し、検体との間でハイブリダイゼーションを起こさせて特定のDNAだけを固体表面にトラップして検出するDNAチップが注目されはじめています (Nature Medicine 2, 753 (1996))。一方、蛋白質やペプチド、あるいはこれらと相互作用する種々生体関連物質の分析でもプローブ検出が用いられ、DNAチップに相当するペプチドチップなどが用いられ始めている。

【0003】 このように固体表面にペプチドやDNAを固定して検体との間でハイブリダイゼーションを行い、分離検出する方法は、放射性標識をもちい、メンブレン上に固定したプローブで目的DNAなどの存在を調べるプロット法として昔から用いられてきた。しかし、ガラスあるいはシリコンといった固体表面の小さな領域 (1 cm²) に沢山のプローブを固定したDNAチップは試料の節約ができると同時に非常に多くの種類のプローブを用いて検査できる等の利点がある。これらDNAチップの作製法には大別して2つがある。第一は半導体などで用いる光マスクの方法を用いて固体の区画された狭い領域 (0.05mm-0.2mm四方) にDNAプローブを一塩基ずつ光化学反応により合成していく方法である (Science 251, 767 (1991))。第2は合成したDNAあるいはPCR増幅したDNA、クローニングで得たDNAを固体表面の小さな区画に

プローブの区画ごとに固定していく方法である (Nature Biotech 16, 27 (1998))。この方法では必要なプローブを持ったペプチドチップやDNAチップを比較的簡単ににつくれる利点があり、多くのベンチャー企業が採用している。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 DNAをはじめとする生体物質のプローブチップは期待のおおきな検査技術であるが、実用化には 1) 少量多品種を安く作れる事、2) プローブ固定の均一度が良い事、3) データの再現性が良い事、くりかえし使用できる事、4) 非特異的吸着を除くため加熱できること、などが必要である。しかし、プローブを固体表面に液滴としてのせて固定化するので、区画毎にばらつきが出る、作るのに手間がかかる、プローブの位置を決めることと固体表面に固定する事を同時に行っているのであまり細かいプローブ固定区画はつくれない、プローブの均一度も良くない、などの問題点がある。また、これらの多くは吸着などにより固定されており、固体との結合力が弱く、加熱によりプローブが表面から剥離したりすることがある。

【0005】

【課題を解決するための手段】 上記課題を解決するために、プローブの固体表面への固定と、プローブの配列を別工程にした。これにより、均一に固体表面にDNAプローブを作製することができる。プローブの固定は共有結合で行うことができるので熱に強く、非特異的吸着などを加熱除去するのに適している。微粒子をプローブを固定する固体として用い、それらを並べる事で目的にあった区画サイズのプローブアレーを作製する。配列するプローブ付き微粒子を交換することで容易に目的のプローブアレーを作製することができる。これら微粒子を並べる方法は微粒子が直径0.3mm程度のサイズではピンセットでつまんで並べることができるが、0.1mm以下になると困難である。そこで、微細な穴をもったシートを用い、この穴に微粒子を保持して運び、キャピラリーあるいは平板にもうけた溝等に並べることによりプローブアレーを作製する方法およびその作製装置を提供する。また、別の方法として液体フロー中に微粒子を一個ずつ制御しながら流し込んでそれをキャピラリーに受けることでプローブアレーとする。本明細書において、「アレーとする」とは、プローブ付き微粒子を一次元または二次元に配列させてプローブアレーの構成とすることを意味する。さらに、計測の再現性等を高めるために複数のプローブ付き微粒子をプローブ毎に複数個ならべて検査のばらつきなどを確認して信頼度の高いデータが得られるようにした。

【0006】 すなわち本発明は、以下の (1) ~ (18) を提供する。

(1) プローブの種類ごとに複数の微粒子にプローブを固定化し、複数のプローブに対する該微粒子を定められ

た個数ずつ集めてアレーとしたことを特徴とするプローブアレー。

【0007】(2) 微粒子表面にプローブを固定化し、該固定化微粒子をプローブの種類ごとに決められた順序で一次元あるいは二次元に配列させて生体関連物質のプローブアレーを構成することを特徴とするプローブアレーであって、マーカーとなる微粒子を一定間隔で配置したことを特徴とする、上記プローブアレー。

(3) プローブごとに複数の微粒子をプローブアレーホルダーに保持せしめ、種類の異なるプローブを区分するためにサイズの異なる微粒子を分離隔壁として用いたことを特徴とするプローブアレー。

【0008】(4) 種々のプローブを固定化した微粒子をプローブの種類に従って決められた配列でキャピラリーまたは光学セル内に並べる方法において、微粒子よりも大きな穴をもつシートと、該シートに接触し、キャピラリーを保持するか、または溝を有する基板とを相対的に移動可能とし、シートの穴にトラップした微粒子の位置を制御移動し、前記のキャピラリーまたは溝に上記微粒子を順次移送することを特徴とする、プローブアレーの作製方法。

【0009】(5) 単一種類のプローブを固定化した微粒子を穴付きシート上に散布して穴の部分に落とし込む工程と、穴に入らなかった余剰の微粒子を除去する工程と、穴部分に保持された微粒子をキャピラリーまたは溝に移送する工程とを繰り返すことを特徴とする、上記(4)に記載のプローブアレーの作製方法。

【0010】(6) 複数の異なるプローブをそれぞれ固定化した複数の微粒子をシート上の異なる穴に保持し、プローブアレーホルダーまたは該プローブアレーホルダーにつながるキャピラリーへ種類ごとに定められた順序で移送することを特徴とする、上記(4)に記載のプローブアレーの作製方法。

【0011】(7) プローブを固定化した微粒子をプローブの種類に従って決められた配列でキャピラリーまたは光学セル内に並べる方法において、微粒子を導入細管に保持し、溶液と共に微粒子をひとつずつ制御しながら溶液流中に放出し、キャピラリー管内に導入することで種々のプローブ付き微粒子を決められた順序で配列保持してプローブアレーを作製する方法。

【0012】(8) プローブを固定化した微粒子をプローブの種類ごとに異なる区画に分割保持し、その区画の底面にある穴に微粒子を保持し、これを別の基板平面に掘られた溝に落とし込むことによりプローブ付き微粒子を定められた順序で配列させ、ついで別途キャピラリー、溝または光学セルに移送すると同時に間隔を密集させてプローブアレーを作製する方法。

【0013】(9) プローブを固体表面に固定化する手段と、プローブを定められた順序で配列させる手段とを独立して有することを特徴とするプローブアレーの作製

装置。

(10) 種々のプローブを固定化した微粒子をプローブの種類にしたがって決められた配列でキャピラリーあるいは光学セル内に並べるプローブアレー作製装置において、微粒子よりも大きな穴をもつシートと、該シートに接触し、キャピラリーを保持するか、または溝を有する基板とを相対的に移動可能とする手段と、シートの穴にトラップした微粒子の位置を制御移動し、前記のキャピラリーまたは溝に上記微粒子を順次移送する手段とを有することを特徴とする、プローブアレーの作製装置。

【0014】(11) 単一種類のプローブを固定化した微粒子を穴付きシート上に散布して穴の部分に落とし込む手段と、穴に入らなかった余剰の微粒子を除去する手段と、穴部分に保持された微粒子をキャピラリーまたは溝に移送する手段とを有する、上記(10)に記載のプローブアレーの作製装置。

(12) 複数の異なるプローブをそれぞれ固定化した複数の微粒子をシート上の異なる穴に保持する手段と、プローブアレーホルダーまたは該プローブアレーホルダーにつながるキャピラリーへ種類ごとに定められた順序で移送する手段とを有することを特徴とする、上記(10)に記載のプローブアレーの作製装置。

【0015】(13) プローブを固定化した微粒子をプローブの種類に従って決められた配列でキャピラリーまたは光学セル内に並べるプローブアレーの作製装置において、微粒子を導入細管に保持し、溶液と共に微粒子をひとつずつ制御しながら溶液流中に放出する手段と、キャピラリー管内に導入する手段と、導入された種々プローブ付き微粒子を決められた順序で配列保持する手段とを有することを特徴とする、プローブアレーの作製装置。

【0016】(14) プローブを固定化した微粒子をプローブの種類ごとに異なる区画に分割保持する手段と、その区画の底面にある穴に微粒子を保持する手段と、これを別の基板平面に掘られた溝に落とし込むことによりプローブ付き微粒子を定められた順序で配列させる手段と、キャピラリー、溝または光学セルに移送すると同時に間隔を密集させる手段とを有する、プローブアレーの作製装置。

【0017】(15) 微粒子表面にプローブを固定化し、該固定化微粒子をプローブの種類ごとに決められた順序で一次元あるいは二次元に配列させ、生体関連物質のプローブアレーを構成することを特徴とするプローブアレーを有する分析装置。

(16) 上記プローブアレーが、プローブの種類ごとに微粒子に固定化し、該微粒子を複数集めてアレーとしたものであることを特徴とする、上記(15)に記載の分析装置。

【0018】(17) 一次元あるいは二次元に分布し、微粒子を保持できる穴を有するセルと、少なくとも各セ

ルを区画している壁と、微粒子のサイズよりも小さな間隔におかれた光学的に透明な部材とで形成された微粒子アレーホルダーからなるプローブアレー。

(18) 上記(1)～(3)、及び(17)のいずれかに記載のプローブアレーを用いた分析装置。

【0019】

【発明の実施の形態】以下本発明を実施例を用いて説明する。本発明はDNA、RNA、蛋白質、ペプチド他の生体関連物質のプローブアレーに共通であるがここではDNAを例に説明する。

【0020】本発明によるDNAプローブアレーは、キャピラリー管中に一次的に保持する場合と狭い間隙の光学セル内に固体プローブを二次的に保持する場合とがあるが、説明の都合で主としてキャピラリー管を用いた例で説明する。微粒子として、球形のビーズを用いた例で説明するが、矩形あるいは他の形状のものでもよい。ビーズのサイズは1-300ミクロンまで使用可能であるが、ここでは20ミクロンのビーズを用いた例を中心に説明する。なお、ビーズの材質にはガラスあるいはプラスチックのものが普通に利用できるが金等の金属も利用可能である。ここではプラスチックを用いた。

【0021】【実施例1】図1は本発明によるプローブアレーの例である。プローブを保持したプローブビーズ105の直径は20ミクロンであり、キャピラリー103の内径は25ミクロンである。この例では両端にダミーのビーズ106を約20個並べその内側にビーズを999個並べた。10個ごとに黒色のマーカービーズ104を入れ、100個目は赤色とした。マーカービーズ104の数は99個なので、プローブビーズ105の数は900個となる。すなわち900種類のプローブをならべて検査できる。これらは密集すると2mmの幅の中に入るが、ハイブリダイゼーション反応のこと等を考え、やや荒い密度で5mmの領域にこれらを保持した。領域の長さはいくらでも長くても短くても良いが、長すぎるとサンプルが多く必要となり、短いと取り扱いが厄介である上、十分なハイブリダイゼーションを行うだけのサンプルが確保できない場合もある。反応領域の体積は約2.3nlである。両端はストッパーが置かれており、ビーズが流出しないようにできている。サンプルおよび洗浄液は注入口101から注入され、出口102から排出される。プローブ数が1万個でも反応領域の長さは20-30mmで良いため、コンパクトで扱い易い利点がある。

【0022】これに用いる蛍光検出装置は図2に示した様なもので、レーザー光源209から、ミラー及びレンズ205を介して照射されるレーザービーム206とプローブアレー保持キャピラリー202を相対的にスキャンして得られる蛍光を測定する。相対的移動は、ミラーの調節および/またはプローブアレー移動板203によって行い、検出位置204にレーザーを照射する。検出位置204からの発光は、レンズ205、光学フィルタ

ー207、レンズ208を介して検出器210で検出し、データー処理および検出器コントローラー211で処理し、表示装置212に表示する。本発明において、プローブビーズ201の10個毎にマーカービーズが入っており、各ビーズの順番に従ってプローブの種類を容易に知る事ができる。マーカービーズを色分けしておき何番目が容易にわかるようにしてもよいし、マーカービーズの代わりにプローブをつけたビーズに色をつけておき、10個ごとに色が変わるようにしてもよい。この場合、色は蛍光検出の障害とならない波長のものを採用する必要がある。

【0023】【実施例2】次の実施例はビーズを一つずつ定められた順序でキャピラリー内に並べる方法および装置に関するものである。図3及び4はビーズアレー作製方法及び装置の一例である。説明の都合上一本のキャピラリー306にビーズアレーを作製する例で説明するが、実用上はこのようなシート上の穴とキャピラリーが多数並んだものを使用する。ステップ1(図3-a)：ビーズ供給用ノズル309から、第一のプローブが付いたプローブビーズ304(第一のプローブビーズ)を溶液注入口302から注入された溶媒とともにビーズ捕捉用穴305を有するシートを底面に持つセル内に導入する。ビーズを沈殿させ前後左右に液を移動させると、ビーズのうち一つがビーズ捕捉用穴305の中に落ち込む。ステップ2(図3-b)：次いで残りのビーズを溶媒とともに排出口301から除去し、洗浄する。穴305に落ちたビーズ308だけがセルの中に残る。この場合、シートに垂直の方向から穴305に向かって溶媒を噴出させ、穴305の近傍のビーズを除去して、ステップ3でキャピラリーに取り込まれるビーズを穴に落ちたビーズ308だけになるようにしてもよい。穴の底面はキャピラリー保持基板307でふさがれた状態にある。このキャピラリー保持基板307には配列用キャピラリー306が固定されているが、ステップ1、2ではキャピラリー軸と穴305は一致しておらず、ビーズは穴305に保持された状態にある。ステップ3(図3-c)：キャピラリー保持基板307とシートを相対的に動かし、キャピラリー軸と穴305を一致させる。キャピラリー306の他端から吸引あるいは溶液側から圧力をかけプローブビーズ1をキャピラリー内に導入する。この場合移動は穴305のサイズ程度でよく、圧伝素子を使用すると便利である。ステップ4(図4-d)：キャピラリー保持基板307とシートを相対的に動かし、再びキャピラリー軸が穴とずれるようにする。ステップ5(図4-e)：第2のプローブのついたビーズ(第二のプローブビーズ)をセルに導入し、ビーズの内一つを穴305に落とし込む。ステップ6(図4-f)：ステップ2と同様に穴305にあるビーズ以外の余剰のビーズをセル内から除去する。ステップ7(図4-g)：キャピラリー保持基板307とシートを相対的に動かし、キャピラリー軸と穴を一致

させ、第二のプローブビーズをキャピラリー 306 の中に導入する。この結果、キャピラリー 306 内にはプローブ 1 の付いたビーズ（第一のプローブビーズ）とプローブ 2 の付いたビーズ（第二のプローブビーズ）が並ぶ。以下同様のことを繰り返してプローブ付きのビーズアレーを望む配列でつくる。尚、303 はカバー板、310 はストッパーである。

【0024】ここで用いたキャピラリーを取り外して計測時のプローブアレーホルダーとして用いてもよいが、別に用意したプローブアレーホルダーをキャピラリーの下部に取り付け、そこにビーズアレーを移して用いてもよい。プローブアレーホルダーとしては、キャピラリーあるいは溝などが挙げられる。ここでは図 5 に示すプローブアレーホルダーを用いた。図中左端の注入口 403 からサンプルを注入する。十分ハイブリダイゼーションを行った後、注入口 403 から洗浄液をいれて、排出口 402 から未反応のサンプルを除去する。ストッパー 406 により、ビーズの排出は阻止される。計測ユニットに装着して、ビーズ配列用溝 404 に配列させた各プローブビーズ 405 にレーザーを照射して発する蛍光を検出する。上部ウィンドウ 407 を透明部材で構成すれば、検出が容易である。もちろん、レーザーを照射して蛍光を得る代わりに化学発光試薬を用いて発光させ、その光を受光してもよい。検出はハイブリダイゼーションの有無が分るものであれば何でもよい。

【0025】ここでは一つのキャピラリーをキャピラリー保持基板に固定した例で説明したが、複数のキャピラリーを用いて同時に大量のプローブアレーをつくる事も可能である。この場合、キャピラリーの数に応じてシートに設けた穴の数を増やす必要があるのは言うまでもない。

【0026】〔実施例 3〕本実施例はタイタープレートに入れられたプローブビーズを含む溶液を種類ごとに決められた順番で順次穴付きシートのある部位（捕捉部位）に送り込み、キャピラリーあるいは平板に掘られた溝に並べていく装置の例である（図 6）。ピペッター 501 でプローブビーズ 508 をタイタープレート 502 のウェル 503 から吸い込み、トランスファー用のビーズ保持ウェル 505 に移す。ウェル 505 の底面には捕捉用の穴があいている。捕捉部位に注入されたプローブビーズ 508 のうち 1 つ（穴を複数設けた場合は複数個）が穴に落ち込む（509）。各穴にビーズが落ち込んだ事を光学的に確認する。ついで洗浄液を流し余剰のビーズを回収または除去する。ビーズ捕捉穴とビーズアレー配列用溝 507 あるいはキャピラリーの間には圧電素子 510 などで駆動できる弁 511 が設けてあり、これを動かすことでビーズを溝 507 あるいはキャピラリー側に移動できるようにする。実際の移動は液体のフローを利用する。穴付きビーズホルダー 504 を動かし穴と溝 507 あるいはキャピラリーの中心を一致させ、捕

捉したビーズを溝あるいはキャピラリーに移動させてもよい。ビーズの移動が終了後に弁 511 を動かすか、または穴とキャピラリーをずらし、ビーズを穴に捕捉できるようにする。次のプローブ付きビーズをピペッター 501 で捕捉部位に導入する。以下同様のことを繰り返してビーズアレーを作製する。作製したビーズアレーはそのままあるいは別の容器に配列を保った状態で移動してプローブアレーとして用いる。尚、506 は配列したプローブビーズ、512 は保持基板である。このような操作は複数の穴をもったシステムで行い、アレー作製の時間を短縮したり、同一アレーを複数同時に作製する事もできる。

【0027】〔実施例 4〕実施例 2 ではセルはひとつで一回に一種類のプローブビーズを扱ったが、この例は複数のセルをもち複数種のプローブを区分けして保持する事で作製効率をあげた例である。図 7 に示すように回転円盤 601 に矩形のセル 603 を複数個配置する。各セル 603 の底面には実施例 1 と同様の穴付きシートが具備されている。シートを具備した回転円盤の下部はキャピラリーを保持した基板と接触しており、穴に捕獲されたビーズが落下しないようになっている。回転円盤 601 を移動させ穴とキャピラリー軸が一致するようになると前例と同様にしてプローブビーズをキャピラリーの中に移行する。穴はキャピラリー数に応じた数だけある。穴の配置はキャピラリーの配置に一致させてあるが回転移動時にずれることを防ぐため、CD-ROM と類似のトラッキング技術を用いてキャピラリー付きのブロックを回転円盤 601 の回転軸 602 方向に移動して調整する機構を具備している。実施例では直径 1.6 cm の回転板を用いた。中心から 5 cm のところに幅 1 mm 長さ 30 mm のセルを配置してある。セルのピッチは 2 mm であり、円周上に 150 ほどのセルを作ることができる。セルの下面には穴付きシートが張ってあり穴のピッチは 2 mm である。この例では合計 10 個の穴を並べ一度に 10 個のキャピラリーにプローブビーズアレーを作ることができる。もちろんキャピラリーの数、一度に作製できるプローブアレーの数は必要に応じて変えられる。尚、604 はセル 603 に設けられたビーズ保持用穴である。

【0028】回転板は高速回転モードとゆっくりであるが高精度で回転するモードの二つがある。セル内にビーズを溶液とともにいれる。円盤をゆするとともに穴から溶液を排出し、ビーズを穴に落とし込む。次いで高速回転モードになり、遠心力と溶液の流れで余剰のビーズをセル先端のビーズ溜に移動させる。回転を停止し、プローブビーズ 1 がキャピラリーの位置にあうように高精度回転モードでセットする。底面部のシャッターを開き、キャピラリー管を保持したブロックを回転板に接触させ溶液の流れと共にビーズをキャピラリー内へ移す。次いで回転板を高精度モードで回転させプローブビーズ 2 を含むセルがキャピラリーの位置にくるようにする。以下

順次ビーズをキャピラリーに移行し、定められた順序でプローブビーズアレーを作製する。円盤を交換するか各セルに入れるプローブビーズを交換して同じ事を繰り返して多くのプローブビーズをキャピラリーに配置しながら保持できる。セルに入れるビーズの色を10個ごとに覚えておくとして作製したプローブビーズアレーのプローブの位置を確認するうえで都合が良い。

【0029】〔実施例5〕次の実施例は、液体フローを用いてプローブビーズを一つずつ定められた順序でキャピラリー内に並べる方法および装置に関するものである。図8はこの概要を示した。プローブビーズ702は、ビーズ溶液溜701から、移送管703、シースフローセル704を介してポンプでキャピラリーに運ばれる。キャピラリーの先端部は移送液705の流れの中に入れられ、移送用キャピラリー706の先端からビーズをひとつずつ液体流中に放出する。ほぼ一定の時間間隔でビーズは液体流中に放出されるが、これを安定化するためにビーズを保持したキャピラリー707にはキャピラリーの軸に沿って節ができるように超音波が加えられている。超音波の強度等の条件をコントロールすること

で一定時間毎にビーズを一つずつ液体の流れの中に放出する。尚、708は保持基板、709は溶液排出管である。

【0030】〔実施例6〕これまでの例ではプローブの種類に対して一個のビーズを対応させたが、ハイブリダイゼーション反応のばらつきを見たり検出感度を高めるには一つのプローブあたり複数個のビーズを対応させると都合が良い。各プローブで対応するビーズの個数は必ずしも同じである必要はない。この場合異なるプローブビーズ802の間に目印となる色またはサイズの異なる区分用ビーズ803を入れる必要がある。図9はこの例である。作製に要する装置は基本的には前述のものと一致するが、プローブ保持用キャピラリー804の内径をプローブビーズ802のサイズよりも数倍以上大きくして複数のビーズが穴にトラップされるようにする。以下の動作は前と同じである。尚、801はダミービーズ、805は溶液排出管である。

【0031】なお、前の例で述べたフローシステムを用いるとビーズアレーの作製は楽になる。ビーズ溜から少量のビーズをピペットで分取し、液体フロー中に注入する。注入されたビーズの数は確定できないが順次キャピラリーへ収納できる。別の種類のビーズを注入するまえにアイソレータとして色つきビーズあるいはサイズの違う区分用ビーズ803を注入することで、注目しているのが何番目のビーズでどんなプローブを持っているのか識別することができる。

【0032】〔実施例7〕前実施例のプローブアレー作製法はキャピラリーの中に配列させる例であったが、図10に、平面上に設けた溝にビーズを配列させ、それを密集させてプローブアレーとして用いたり、キャピラリ

ーの中に移動してプローブアレーとして用いるための方法および装置を開示する。まず平面上に複数の溝を持つビーズアレー作製用ホルダー905を用意する。この溝906にプローブビーズ907を並べてキャピラリーなどに配列を保ったままビーズを移動してプローブアレーを作製するが、複数の溝906に入れられて配列したプローブビーズ907はそれぞれ異なるキャピラリー908に導入され、プローブアレーとして使用される。ビーズアレー作製用ホルダー905の上にはビーズを穴にトラップして保持し上記溝906まで移動するための穴付きシート904が置かれている。この穴付きシート904は図10に示したようにビーズアレー作製用ホルダー905の溝906と直行するように作られた細溝保持板901の溝（ビーズ溜902）とその底に開けられたビーズ保持用の穴903を持っている。やはり複数の溝を持つがこれらにはそれぞれ異なるプローブ付きビーズが注入され、その穴に溝ごとに異なるプローブビーズ907を保持させるための物である。これら2つのシートあるいは平板は密着して使用されるが相互にスライドできる。まず、穴付きシート904の穴903とビーズアレー作製用ホルダー905の溝906の位置がずれた状態におかれる。プローブビーズ907を穴付きシート904の各溝にプローブの種類ごとに分けられた状態で補給される。穴には一つのプローブビーズ907が入るがこの状態で底面は塞がれているのでここに保持される。穴付きシート904の穴903とビーズアレー作製用ホルダー905の溝906の位置を合わせるとビーズがそれぞれの穴903から1つずつ溝906に落ち込む。各溝906にはそれぞれのプローブビーズ907が1つずつ落ち込むので種々のプローブビーズ907が各溝906に保持される。ビーズの置かれた間隔は穴付きシート907のビーズ溜902の間隔とほぼ一致しており、この例では2mmである。ビーズアレー作製用ホルダー905の溝906に落とし込まれたプローブビーズ907の数はこの例では合計50個である。また、同時に作製されるビーズアレーは10個であるが必要に応じて増やすことができる。ビーズを落とし込んだら再び穴付きシート904の穴903とビーズアレー作製用ホルダー905の溝906の位置をずらして溝を密封型とし、溶液と共にビーズをキャピラリー908へ導く。プローブビーズ907の種類を多くする場合には上記の操作を繰り返すことで達成される。上記実施例では一次元に配列したプローブビーズアレーを開示したが、これらを複数個並べたり、2次元に配列させることでより多くの種類のプローブを持ったプローブアレーを作れることはいうまでもない。

【0033】〔実施例8〕本実施例はプローブビーズアレーホルダーが一次元あるいは二次元に分布した穴付きプレートとカバーガラスで構成されるセルを用いる例である。これは非常に小さなタイタープレートに似たもの

である。図 11 に示すように、プローブビーズ 1004 を入れたタイタープレートからビーズを少量マイクロピペットを用いて分取しマイクロタイタープレート 1001 の穴 (セル 1003) に移す。1002 はスペーサーである。ビーズについているプローブの種類とプレート上の穴の位置を対応させてプローブビーズを保持したマイクロタイタープレートに似たビーズアレーを作る。ビーズを入れたあとで光学的に透明で蛍光計測あるいは化学発光計測に支障のないカバーガラス 1005 をかぶせてセルアレーとし、例えばレーザー光 1008 を照射して、発光をレンズ 1009 を介して検出器 1010 で検出する。カバーガラス 1005 とマイクロタイタープレート状のセルアレーの各セルをしきっている壁とのあいだはビーズサイズより小さくビーズは相互に移動しない。反応液などは溶液排出口 1006 及び溶液注入口 1007 から自由に移動できる。使用に当たってはセルを反転させガラス面が下になるようにしてもちいる。この場合、セルの深さに関わりなくガラス面にあるビーズは反応液と十分接触してプローブはターゲットとハイブリダイゼーションを行うことができる。

【0034】

【発明の効果】以上述べた様に本発明によれば、ペプチドや DNA のプローブアレーを簡便に大量につくることができる。プローブを固体表面に固定するプロセスとプローブを配列するプロセスを分けることにより、それぞれを最適化して行うことができる。このため、均一で固体表面から剥がれにくい固定プローブを作る事ができ、定められた順番に並べることにより簡単に、必要な種類のプローブを持ったアレーを作ることができる。ビーズのサイズを小さくすることにより従来の方法では作製困難な微細なプローブアレーを作ることでもできる。必要な DNA プローブを作製し、ビーズ表面に固定化して作製装置にセットするだけで新しい構成のプローブアレーを作製することができるので、ユーザーのほしい物をいつでも提供できる。同一プローブを持つビーズを複数個配列することにより統計平均を取ることができ再現性、定量性等をあわせて調べる事が出来、信頼のおける測定が実行できる。また、平面保持の DNA チップ等によるプローブアレーと異なり表面積がおおきく、反応をより速やかに行う事が出来るとともに高感度がえられる。ビーズのサイズは 1 ミクロンから 300 ミクロンまで変える事ができるので、高密度のプローブアレーが必要な時でも容易に作る事ができる。たとえば、6 ミクロンのビーズを用いると、キャピラリー 10 mm あたり 1500 個のプローブを保持する事ができ、二次元のプローブアレーホルダーを用いると 1 平方センチあたり 100 万個以上のプローブを並べる事ができる。作製するときと同じプローブ配列をもったアレーを複数個同時に作製することは非常に容易であり、量産にも向いている。

【図面の簡単な説明】

【図 1】キャピラリー内に配列したプローブビーズからなるプローブアレーチップの概念図である。

【図 2】キャピラリーなどに保持されたプローブビーズアレーを計測する検出システムの概念図である。

【図 3】ビーズ配列装置の部分断面図である。

- a) オフライン状態でのビーズ供給の概念図である
- b) 穴にビーズをトラップした状態の概念図である
- c) ビーズをキャピラリーなどに移行する状態の概念図である

【図 4】ビーズ配列装置の部分断面図である。

- d) キャピラリーにビーズが 1 個保持された状態の図
- e) 第 2 のプローブビーズを捕獲する穴に落とし込んだ状態の図
- f) 余分なビーズの除去
- g) 捕獲されたビーズをキャピラリーに導入する図

【図 5】溝型ビーズ配列治具の概念図である。

- a) 外観図
- b) 断面図

【図 6】溝と可動弁を用いたビーズアレー作製方法の概念図である。

- a) プローブビーズの溜からビーズを吸い取り、溝に並べていくプロセスの概念図
- b) ビーズを 1 個ずつ捕獲するデバイスの断面図

【図 7】円盤型プローブビーズ移送システムの概念図である。

【図 8】液体フロー式ビーズアレー作製法の概念図である。

【図 9】多数のプローブビーズを区分ビーズで分離したタイプのビーズアレーの概念図である。

【図 10】穴付きシートを用いたプローブビーズ配列方法の概念図である。

【図 11】マイクロタイタープレート型のビーズアレーホルダーの概念図である。

- a) 概念見取り図
- b) 断面図
- c) 計測時の概念図

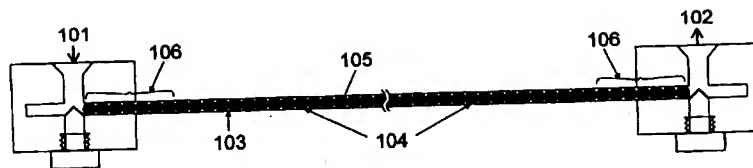
【符号の説明】

101 : 溶液および試料注入口、102 : 出口、103 : キャピラリー、104 : マーカービーズ、105 : プローブビーズ、106 : ダミーのビーズ
 201 : プローブビーズ、202 : プローブアレー保持キャピラリー、203 : プローブアレー移動板、204 : 検出位置、205 : レンズ、206 : 照射レーザー、207 : 光学フィルター、208 : レンズ、209 : レーザー光源、210 : 検出器、211 : データ処理および検出器コントローラー、212 : 表示装置
 301 : 排出口、302 : 溶液注入口、303 : カバー板、304 : プローブビーズ、305 : ビーズ捕捉用穴、306 : 配列用キャピラリー、307 : キャピラリー保持基板、308 : 捕獲されたビーズ、30

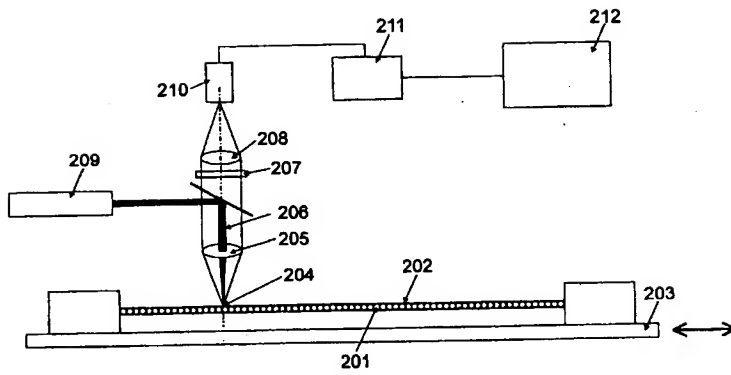
9 : ビーズ供給用ノズル、 310 : ストッパー
 401 : プローブアレーホルダー、 402 : 排出口
 403 : 注入口、 404 : ビーズ配列用溝
 405 : プローブビーズ、 406 : ストッパー
 407 : 上部ウィンドー
 501 : ピペッター、 502 : タイタープレート、
 503 : ウェル、 504 : 穴付きビーズホルダー
 505 : ビーズ保持ウェル、 506 : 配列したプロ
 507 : ビーズアレー配列用溝、 508 :
 509 : 穴に捕獲されたプローブビーズ
 510 : 圧電素子、 511 : 弁、 512 : 保持基板
 601 : 回転円盤、 602 : 回転軸
 603 : セル、 604 : ビーズ保持用穴
 701 : ビーズ溶液溜、 702 : プローブビーズ、
 703 : 移送管
 704 : シースフローセル、 705 : 移送液、 70

6 : 移送用キャピラリー管
 707 : キャピラリー、 708 : 支持基板
 709 : 溶液排出管
 801 : ダミービーズ、 802 : プローブビーズ、 80
 3 : 区分用ビーズ、 804 : プローブ保持用キャピラリ
 ー、 805 : 試料流路
 901 : 細溝保持板、 902 : ビーズ溜、 903 :
 穴
 904 : 穴付きシート、 905 : ビーズアレー作製用
 1001 : マイクロタイタープレート、
 1002 : スペーサー、 1003 : セル、 100
 4 : プローブビーズ、 1005 : カバーガラス、 10
 06 : 溶液排出口、 1007 : 溶液注入口、 100
 8 : レーザー光、 1009 : レンズ、 1010 : 検出
 器

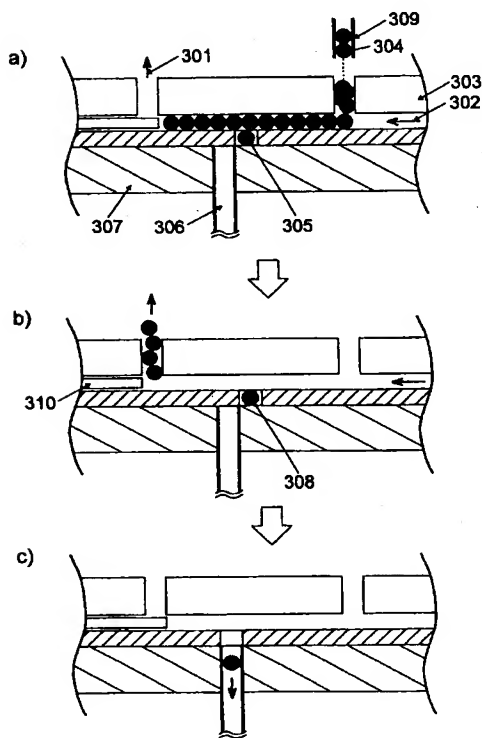
【図 1】



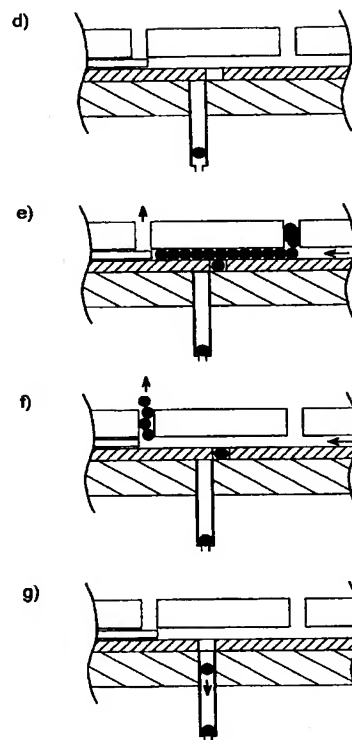
【図 2】



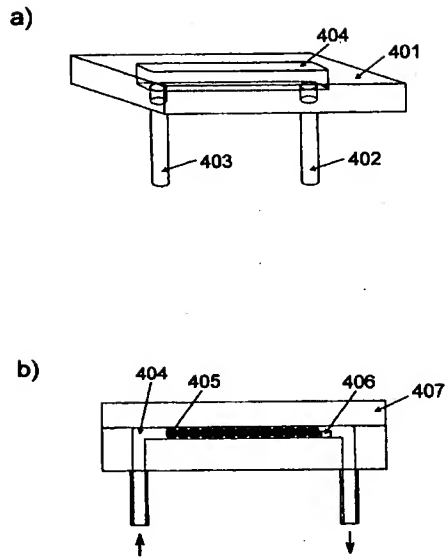
【図 3】



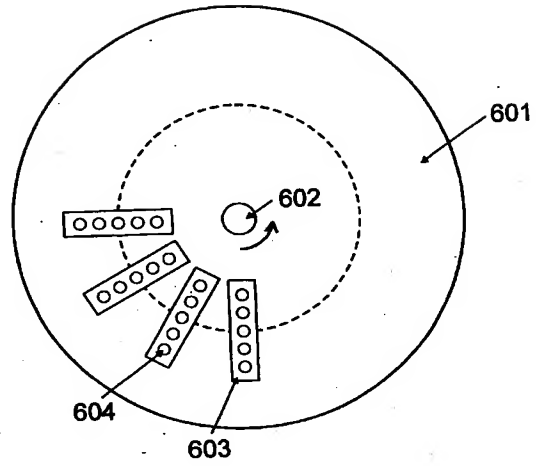
【図 4】



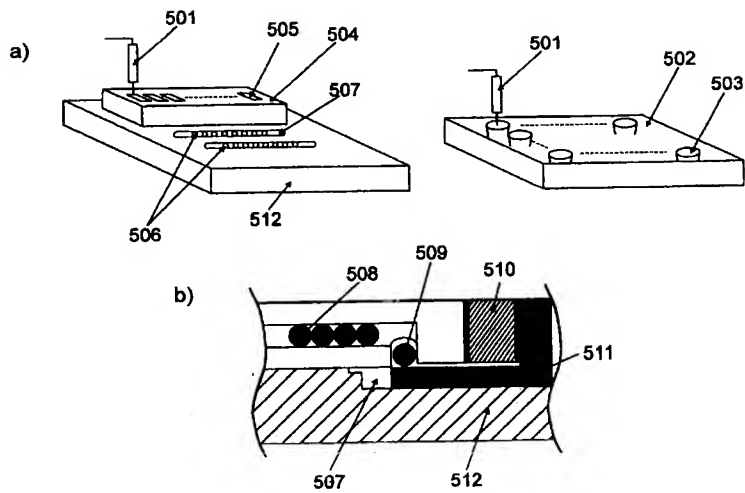
【図 5】



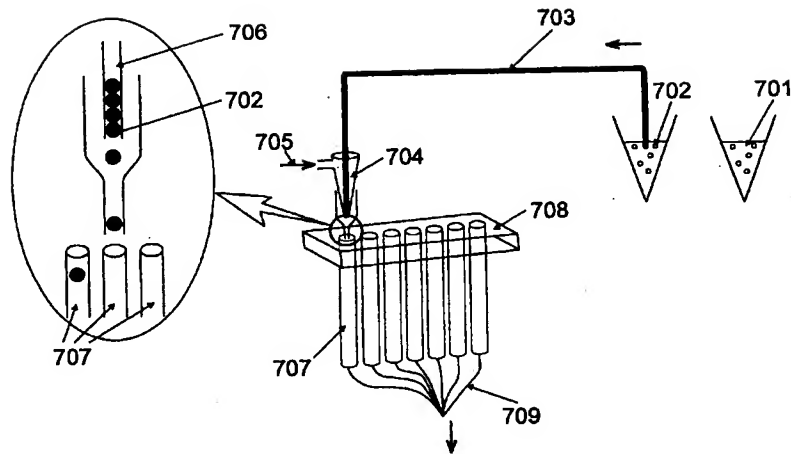
【図 7】



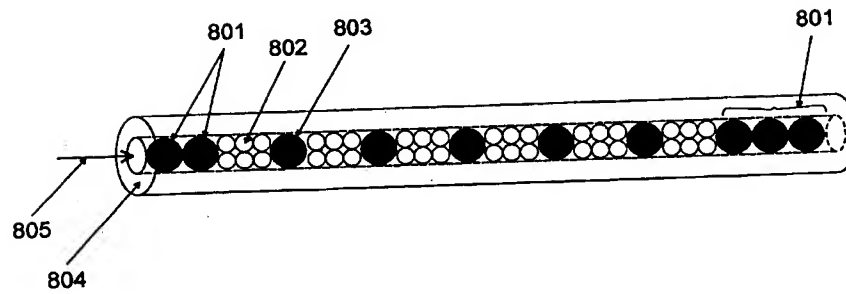
【図 6】



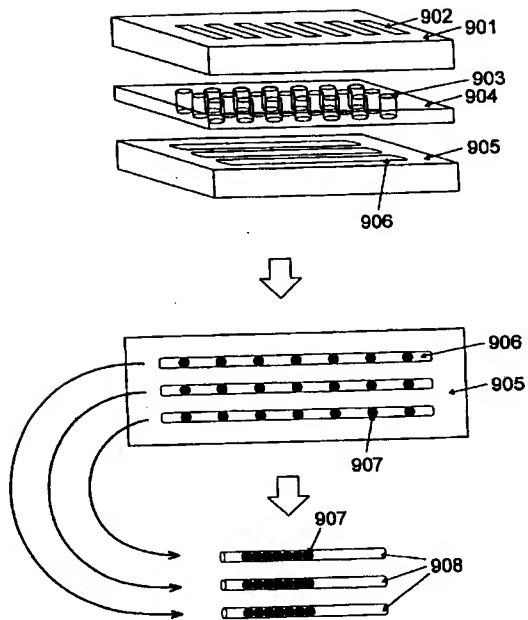
【図 8】



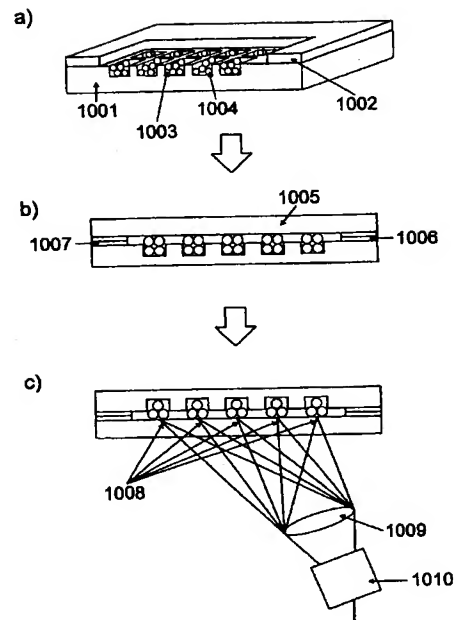
【図 9】



【図10】



【図11】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷
G 0 1 N 33/566
35/02

識別記号

F I
G 0 1 N 35/02
C 1 2 N 15/00

テーマコード* (参考)

F
A